



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

**Espressione e ruolo funzionale dei canali al potassio
voltaggio attivati hERG1 e hEag1 in cellule di
melanoma cutaneo umano A375**

Relatori

Prof.ssa Paola Nieri

Dott.ssa Barbara Adinolfi

Candidato

Elena Lenzi

Anno Accademico 2011/2012

Indice

Capitolo 1.	Introduzione	
	1.1 I canali ionici	5
	1.2 Canali al potassio	5
	1.3 Canali al potassio voltaggio attivati	10
	1.3.1 Canali Ether à go-go hERG1 e hEag1	11
	1.3.2 Localizzazione e ruolo fisiologico	16
	1.3.3 Espressione dei canali hERG1 e hEag1 nei tumori	19
	1.3.4 Bloccanti/apritori dei canali hERG1 e hEag1 e meccanismo d'azione	24
	1.4 Canali hEag1 e hERG1 nel melanoma cutaneo	29
Capitolo 2.	Scopo della Ricerca	31
Capitolo 3.	Materiali e metodi	33
	3.1 Materiali per gli studi funzionali	33
	3.1.1 Farmaci e composti commerciali utilizzati	33
	3.1.2 Linee cellulari	35

3.2 Materiali per gli studi di biologia molecolare	36
3.2.1 Oligo utilizzati	36
3.2.2 Kit e reagenti	37
3.3 Metodi utilizzati negli studi funzionali	38
3.3.1 Scongelo della linea cellulare	38
3.3.2 Mantenimento in coltura	39
3.3.3 Congelamento cellulare	40
3.3.4 Analisi della vitalità cellulare	41
3.4 Metodi utilizzati negli studi di biologia molecolare	44
3.4.1 Estrazione dell'RNA totale	44
3.4.2 Retrotrascrizione	47
3.4.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)	48
3.4.4 Elettroforesi su gel di agarosio	50
Capitolo 4. Risultati e discussione	52
4.1 Profili di espressione ottenuti con PCR dei canali al potassio attivati hERG1 e hEag1	52
4.2 Valutazione dell'azione di CisPt e Temozolomide sulla vitalità delle cellule di melanoma cutaneo umano A375	57

4.3 Canali hERG1: valutazione dell'azione di E-4031 sulla vitalità di cellule di melanoma cutaneo umano A375	60
4.4 Canali hERG1: valutazione dell'azione dell'apritore PD118057 sulla vitalità di cellule di melanoma cutaneo umano A375	62
4.5 Canali hEag1: valutazione dell'azione del bloccante selettivo Imipramina sulla vitalità delle cellule di melanoma cutaneo umano A375	64
Capitolo 5. Conclusioni	67
Abbreviazioni utilizzate nel testo	68
Bibliografia	69
Indice figure	73
Indice tabelle	75

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I canali ionici

I canali ionici sono proteine integrali di membrana presenti in tutti gli organismi viventi; il loro compito è quello di mantenere il bilancio elettrolitico nei due compartimenti *intra-* ed *extracellulare* regolando il flusso di ioni attraverso la membrana cellulare; assumono notevole importanza anche nella regolazione dell'eccitabilità cellulare. Si distinguono in base alla selettività verso ioni e molecole o ai fattori che ne regolano l'apertura e la chiusura. Vengono distinti in base agli ioni di cui garantiscono il passaggio in:

- Canali del K^+
- Canali del Na^+
- Canali del Ca^{2+}
- Canali del Cl^-

1.2 Canali al potassio

I canali al potassio rappresentano una delle più grandi famiglie di canali ionici, sono codificati da circa 300 geni e sono ampiamente rappresentati e differenziati [Asher V. *et al.*, 2010]. Questi canali oltre a consentire il flusso di ioni potassio attraverso il doppio strato lipidico della membrana cellulare, sono coinvolti in tante altre funzioni cellulari dell'organismo:

sono responsabili del mantenimento del potenziale di riposo della membrana, regolano il volume e la proliferazione cellulare, sono responsabili della ripolarizzazione cardiaca, sono coinvolti nella contrazione della muscolatura liscia, nel rilascio di neurotrasmettitori e partecipano alla secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas [Asher V. *et al.*, 2010; Sandhiya S. e Dkhar S. , 2009].

I canali al potassio presentano una struttura tetrameric, sono cioè formati da 4 subunità α che delimitano una struttura *poro* centrale (fig.1).

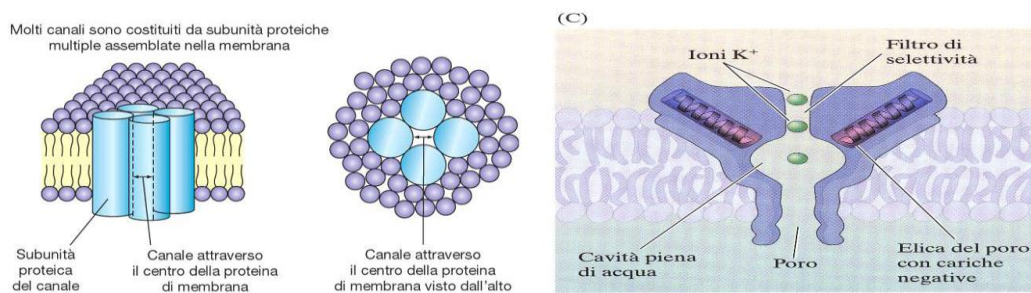


Figura1. Struttura canali al potassio

I canali possono essere distinti in tre classi in base al numero di segmenti transmembrana che vanno a costituire ciascuna delle 4 subunità α :

- Subunità α costituita da 6 segmenti transmembrana (a questa categoria appartengono i canali al potassio voltaggio attivati come hERG1 e hEag1)
- Subunità α formata da 4 segmenti transmembrana
- Subunità α costituita da 2 segmenti transmembrana (in questa classe si trovano i canali K_{ATP}) (fig.2)

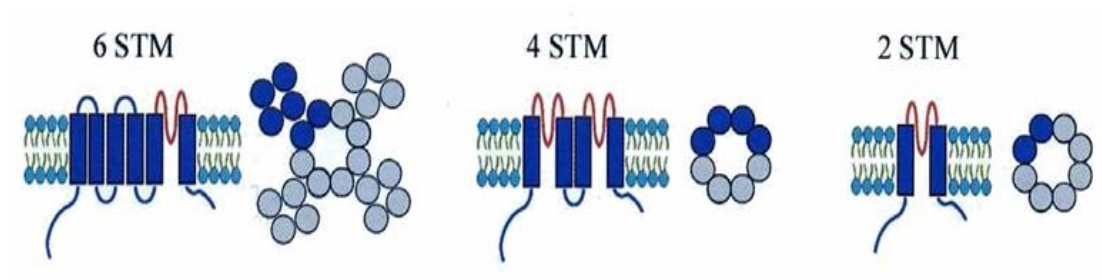


Figura2. Tipi di subunità α nei canali al potassio

Nell'uomo le subunità dei canali al potassio sono codificate da almeno 75 geni, e in tutti i canali troviamo una sequenza di 5 aminoacidi, Treonina-Valina-Glicina-Tirosina-Glicina, che va a formare il filtro di selettività; questo identifica il canale e permette al solo ione K^+ di passare [Sandhiya S. e Dkhar S. 2009].

I canali al potassio possono essere suddivisi in quattro grandi famiglie:

- Canali Kv o CANALI VOLTAGGIO ATTIVATI

Sono canali che presentano 6 segmenti transmembrana per ogni subunità α , una sola struttura *poro* centrale e sono a loro volta divisi in varie sottoclassi; troviamo i canali Kv1-4 (Shaker, Shab, Shaw, Shal-like), i canali Kv7 (chiamati anche KCNQ), i canali Kv5, Kv6, Kv8, Kv9 e i canali Kv10-12 o Famiglia dei canali eag. Tutti questi tipi di canali si aprono in risposta ad una depolarizzazione della membrana, svolgono un ruolo di primo piano nell'eccitabilità elettrica di nervi e muscoli, modulano la trasmissione sinaptica e la secrezione da parte delle cellule endocrine [Felipe A. *et al.*, 2006].

- Canali KCa o CANALI CALCIO ATTIVATI

A questa famiglia appartengono 3 diversi tipi di canali; i KCa1, chiamati anche BK o Canali a Larga conduttanza, i KCa2 o SK (Canali a Piccola conduttanza), che comprendono a loro volta tre sottotipi SK1, SK2 e

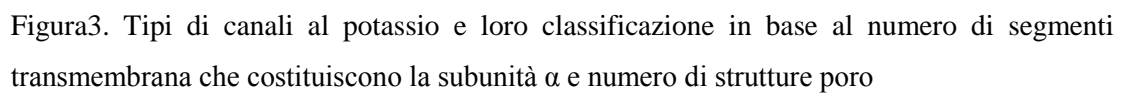
SK3, e i canali IK detti anche Canali a Intermedia conduttanza. Anche questi canali presentano 6 segmenti transmembrana e un solo *poro* centrale, la loro attivazione dipende da un aumento della concentrazione intracellulare di calcio [Felipe A. *et al.*, 2006].

- Canali Kir o CANALI INWARDLY RECTIFYING

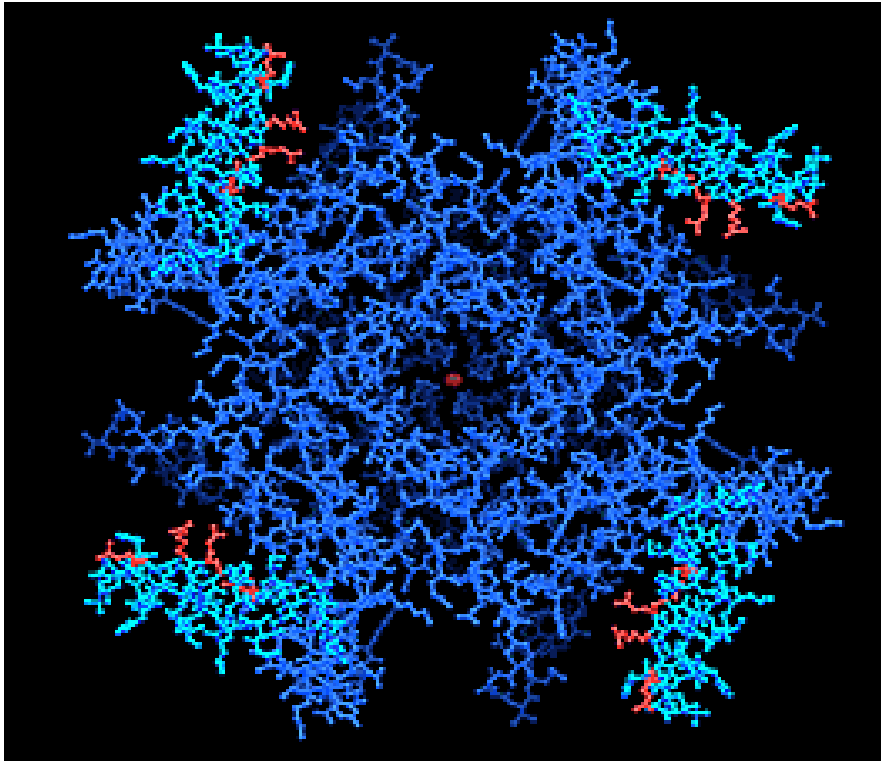
Questi canali presentano 2 segmenti transmembrana per ciascuna subunità α e un unico *poro*, regolano il potenziale di membrana e partecipano al trasporto di ioni K^+ attraverso le membrane. Sono inoltre coinvolti nel controllo del differenziamento cellulare, modulano il rilascio di neurotrasmettitori e sono importanti nella regolazione della secrezione di insulina, nella proliferazione e nel controllo del tono vascolare del muscolo scheletrico. Mutazioni a livello di questi canali portano a disordini nella funzionalità delle cellule β del pancreas nei bambini, e alla sindrome di Bartter caratterizzata da alcalosi ipocalemica, ipercalciuria, e da aumento della concentrazione plasmatica di aldosterone [Felipe A. *et al.*, 2006].

- Canali K2P

In questa classe troviamo canali che presentano 4 domini transmembrana e due regioni *poro*; le loro caratteristiche funzionali sono quelle tipiche degli altri tipi di canali al potassio, quindi ruolo nel mantenimento del potenziale di riposo della membrana e regolazione dell'eccitabilità cellulare. La loro attività può essere modulata dal pH, da acidi polinsaturi, e sembrano essere coinvolti nel processo di apoptosi cellulare e nella genesi di tumori [Lei Z. *et al.*, 2009; Felipe A. *et al.*, 2006].
(fig.3)



1.3 Canali al potassio voltaggio attivati



I canali al potassio voltaggio attivati, come tutti i canali voltaggio-dipendenti, sono complessi proteici costituiti da più di una subunità, di cui la α è la più conservata ed è responsabile della selettività del canale stesso. Ciascuna subunità α comprende 6 segmenti transmembrana S1-S6, una regione P (poro) delimitata dai segmenti S5-S6, e due regioni N- e C-terminale localizzate nella regione intracellulare del canale stesso [Wray D., 2004; Fiske J. *et al.*, 2006].

Da un punto di vista funzionale i canali al potassio voltaggio dipendenti possono essere distinti in tre categorie:

- Canali K_A o *transient*, aventi conduttanza pari a 15-20 pS, si aprono rapidamente in risposta alla depolarizzazione e si disattivano altrettanto rapidamente se la depolarizzazione persiste.
- Canali K_v , con conduttanza di 10-65 pS, rispondono alla depolarizzazione in modo lento e per questo vengono detti *delayed rectifier*.

Entrambi questi due tipi di canali consentono al solo ione K^+ di fluire verso l'esterno della cellula e svolgono un ruolo di primaria importanza nella ripolarizzazione della membrana cellulare.

- Canali K_{IR} o *inward rectifier*, con una conduttanza di 5-30 pS, permettono agli ioni potassio di fluire sia verso l'interno che verso l'esterno della cellula e hanno il compito di mantenere stabile il potenziale di riposo della membrana in molte cellule; questo assume notevole importanza nei miociti cardiaci.

1.3.1 Canali Ether à go-go hERG1 e hEag1

Alla famiglia dei canali Ether à go-go, o più semplicemente “Canali Eag”, appartengono i canali al potassio voltaggio attivati. Furono descritti per la prima volta nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* mediante esperimenti di mutagenesi [Pardo L. 2004]. Una clonazione posizionale permise l'identificazione del gene responsabile del fenotipo mutato, e quella proteina risultò avere forti analogie strutturali con i canali al potassio, come dimostrato in seguito da indagini sull'espressione funzionale [Pardo L. 2004]. La ricerca di omologhi umani agli *eag* identificati nel moscerino, ha portato all'identificazione di

tre sottofamiglie nell'uomo, ciascuna delle quali presenta due o più membri:

- Canali *eag* (Kv10)

In questa famiglia troviamo 2 sottotipi di canali *eag*, i Kv10.1 (chiamati anche Eag1 o KCNH1) e i Kv10.2 (detti Eag2 o KCNH5). Entrambi, se attivati, portano ad attivazione di deboli correnti del K^+ e mostrano una marcata dipendenza dai cationi bivalenti presenti a livello extracellulare. Il canale Eag1 sembra inoltre essere implicato nei processi di proliferazione cellulare [Pardo L., 2004].

- Canali *erg*, *eag*-related (Kv11)

A questa classe appartengono 3 diversi tipi di canali *erg*, i Kv11.1 (detti *erg1* o KCNH2), i Kv 11.2 (*erg2* o KCNH6) e i Kv11.3 (chiamati anche *erg3* o KCNH7). I sottotipi *erg2* ed *erg3* sono espressi quasi esclusivamente nel tessuto nervoso, mentre i canali *erg1* hanno suscitato da sempre un grande interesse per la loro localizzazione a livello cardiaco; questo sottotipo mostra una rapida cinetica di attivazione che porta alla generazione di una corrente attraverso il canale stesso in seguito a ripolarizzazione della membrana [Pardo L., 2004].

- Canali *elk*, *eag* like (Kv12)

A questa sottofamiglia appartengono 3 sottotipi: i Kv12.1 detti *elk1*, i Kv12.2 o *elk2*, e i Kv12.3 o *elk3* [Felipe A. *et al.*, 2006].

Questi canali sono risultati espressi nell'uomo, ed indicati come hERG1 e hEag1.

Struttura dei canali hERG1 e hEag1

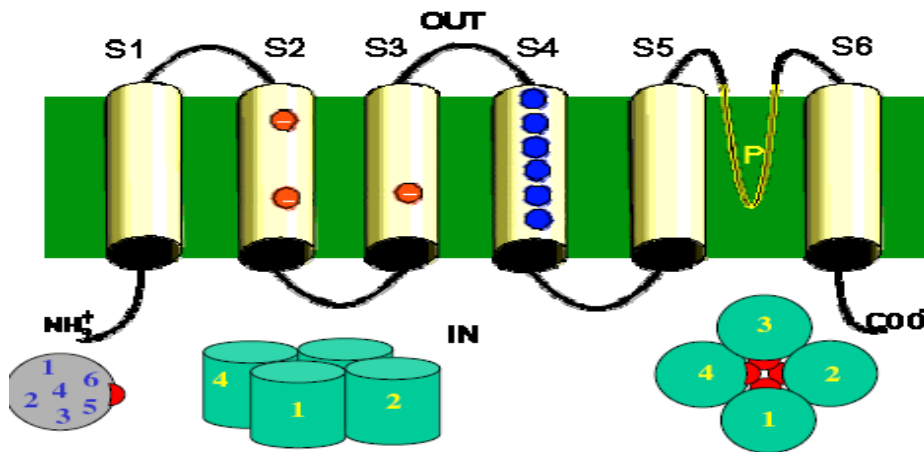
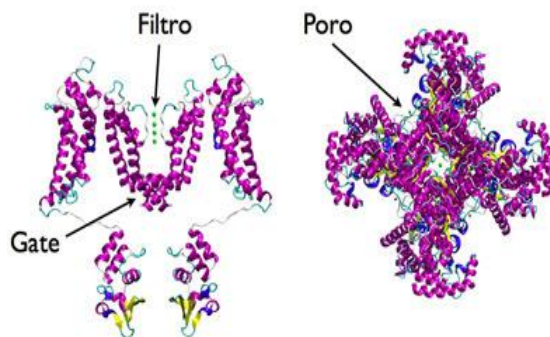


Figura4. Struttura dei canali hERG1 e hEag1

I canali hERG1 e hEag1 presentano le caratteristiche strutturali dei canali al potassio voltaggio attivati. Sono proteine integrali di membrana costituite da 4 subunità α , ciascuna delle quali è formata da 6 segmenti transmembrana STM1-STM6. In questi canali possiamo individuare vari domini funzionali:

- S1-S4, complesso di gating
- S5-P-S6, regione poro
- S4, sensore di voltaggio



La selettività ionica e la zona del poro (P) sono state identificate nella zona di congiunzione dei segmenti S5 e S6, in cui una ventina di aminoacidi ripiegati all'interno del doppio strato lipidico di membrana formano il contorno del poro P. Il sensore del voltaggio che regola l'apertura del canale è localizzato nei segmenti S4 ricchi di aminoacidi carichi positivamente, come Arg e Lys, intervallati, ogni 3 residui, da aminoacidi idrofobici [Asher V. *et al.*, 2010]. Le cariche positive si trovano così sulla faccia esterna di strutture “a paletta” formate dalla porzione distale di S3 e da quella prossimale di S4, con una conformazione elica-giro-elica. (fig.5)

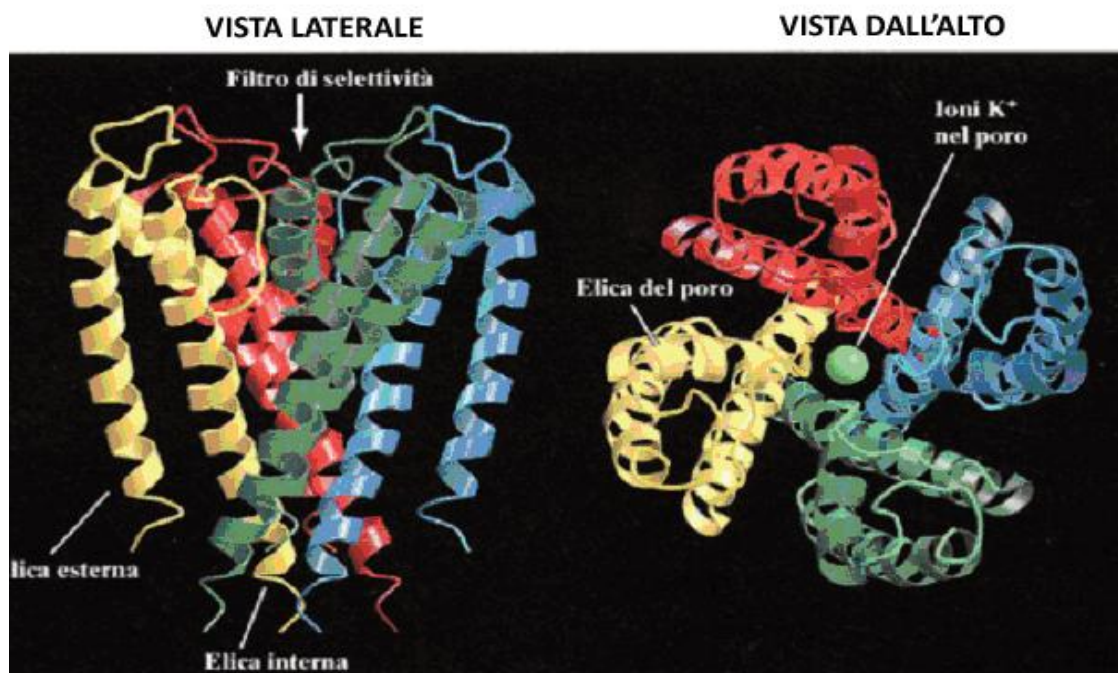


Figura5. Struttura canali hERG1 e hEag1 vista lateralmente e dall'alto

La positivizzazione del potenziale, indotta dalla depolarizzazione della membrana, determinerebbe la rotazione verso l'esterno della “paletta” carica positivamente. Tale riarrangiamento conformazionale, attraverso la

regione di connessione tra S4 e S5, si trasmette a S5 determinando l'apertura del poro [Wray D. 2003; Jang *et al.*, 2003]. Nella regione N-terminale della subunità principale del canale, una sequenza di aminoacidi idrofobici definisce il gate di inattivazione, formando una struttura che ostruisce il poro durante il processo di inattivazione.

La porzione N-terminale del canale presenta un particolare dominio detto PAS (Per-Arnt-Sim), coinvolto nelle interazioni proteina-proteina [Wray D., 2003], mentre nella regione C-terminale sono presenti un sito di legame per i nucleotidi ciclici (cNBD) e due particolari sequenze dette NES (*nuclear export sequences*) e NLS (*nuclear localization sequences*), che sembrano giocare un ruolo importante nella localizzazione perinucleare dei canali [Asher V. *et al.*, 2010].

Per quanto riguarda il canale hEag1 esistono anche dei siti di legame per la Calmodulina (CaM); l'interazione di questa proteina con il canale e l'elevata concentrazione di calcio intracellulare, provocano la chiusura del canale stesso [Asher V. *et al.*, 2010]. (fig.6)

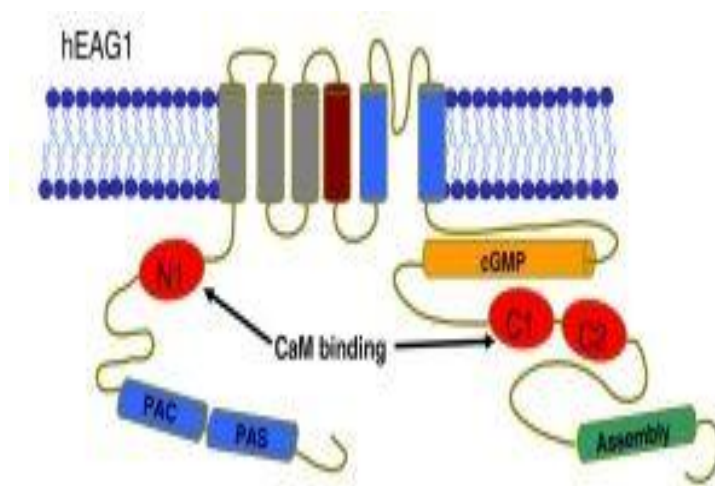


Figura6. Struttura del canale hEag1

Il canale hERG1 presenta tutte queste caratteristiche strutturali. La sua regione N-terminale è costituita da circa 390 aminoacidi; oltre al dominio PAS, presente anche nel canale hEag1, si trova un altro sito importante, specifico per il canale stesso, compreso tra l'aminoacido 135 e il segmento transmembrana S1, la cui struttura tridimensionale non è ancora nota. Mutazioni a livello di questa regione provocano cambiamenti delle proprietà biofisiche del canale e una sua delezione determina un aumento della velocità di attivazione. (fig.7)

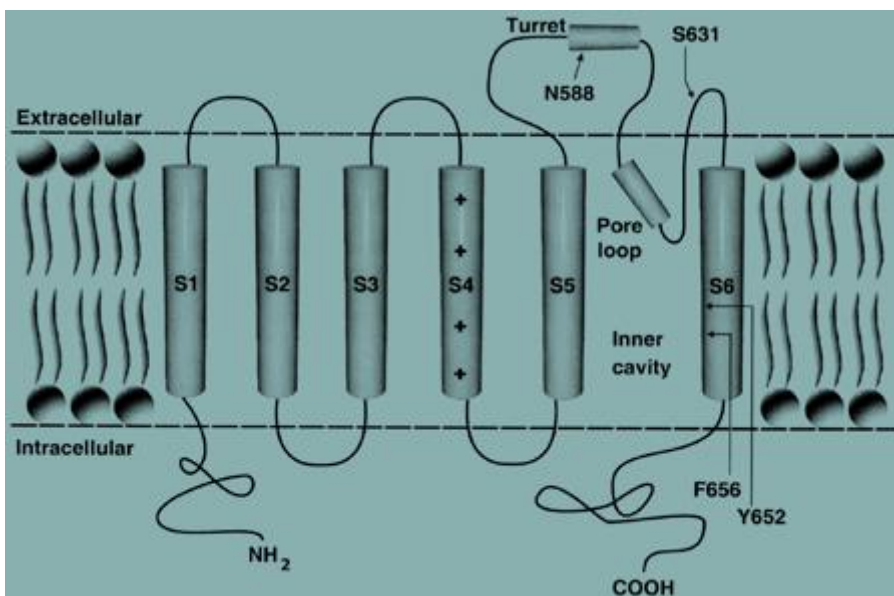


Figura7. Struttura canale hERG1

1.3.2 Localizzazione e ruolo fisiologico

Canali hEag1

Questo tipo di canali voltaggio dipendenti hanno una localizzazione molto ristretta a livello dei tessuti sani. Sono stati identificati in:

- Sistema Nervoso

Sono presenti a livello delle strutture limbiche dove sembrano essere implicati nella trasmissione delle informazioni emozionali; risultano espressi a livello dell'ipotalamo dove modulano le funzioni neurovegetative ed endocrine; nelle cellule Purkinje, nei nuclei cerebellari e sono coinvolti nella trasmissione dei segnali alla corteccia. Si ritrovano anche a livello del corpo striato, del nucleo subtalamico e della sostanza nera, dove controllano il flusso di informazioni ai gangli basali [Martin S. *et al.*, 2008].

- Placenta

- Tratto gastrointestinale (cellule gastriche e acini pancreatici)

- Cellule spermatogeniche [Hemmerlein B. *et al.*, 2006]

- Cellule dell'endometrio e dell'endocervice

- Mioblasti

Si trovano espressi in maniera transiente a livello dei mioblasti prima della loro fusione, dopo di che la loro espressione diminuisce e non vengono individuati nelle cellule del muscolo scheletrico.

I canali hEag1 sembrano svolgere un ruolo nel ciclo cellulare. Durante la Fase M del ciclo diventano più selettivi verso gli ioni potassio, risultano sensibili al blocco da parte del sodio intracellulare e mostrano una densità di corrente più bassa rispetto a quelle manifestate nelle fasi G1, S o G2 [Camacho J., 2005; Pardo L.A. *et al.*, 2005].

Canali hERG1

Questi canali risultano più ampiamente espressi rispetto agli altri componenti della famiglia eag, hEag1. Sono stati identificati in :

- SNC

A livello del Sistema Nervoso sono responsabili del mantenimento del potenziale di membrana e sono coinvolti nello sviluppo dei neuroni del cordone spinale.

- Tratto gastrointestinale

Partecipano alla regolazione della motilità.

- Sistema endocrino

Questi canali sono coinvolti nella secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas e nel rilascio di epinefrina nelle cellule cromaffini. [Asher V. *et al.*, 2010]

- Cuore

Questi canali sono altamente espressi a livello delle cellule miocardiche e sono coinvolti nella fase di ripolarizzazione cardiaca. Mutazioni di questo canale portano allo sviluppo di patologie a livello cardiaco come la sindrome del QT lungo e la TdP (Torsades de Pointes), in cui l'allungamento del potenziale cardiaco è associato al manifestarsi di tachiaritmie potenzialmente letali. Mutazioni, invece, che riguardano un aumento nella funzionalità del canale, possono portare al manifestarsi della sindrome del QT corto e a morte prematura [Asher V.*et al.*, 2010]. (fig.8)

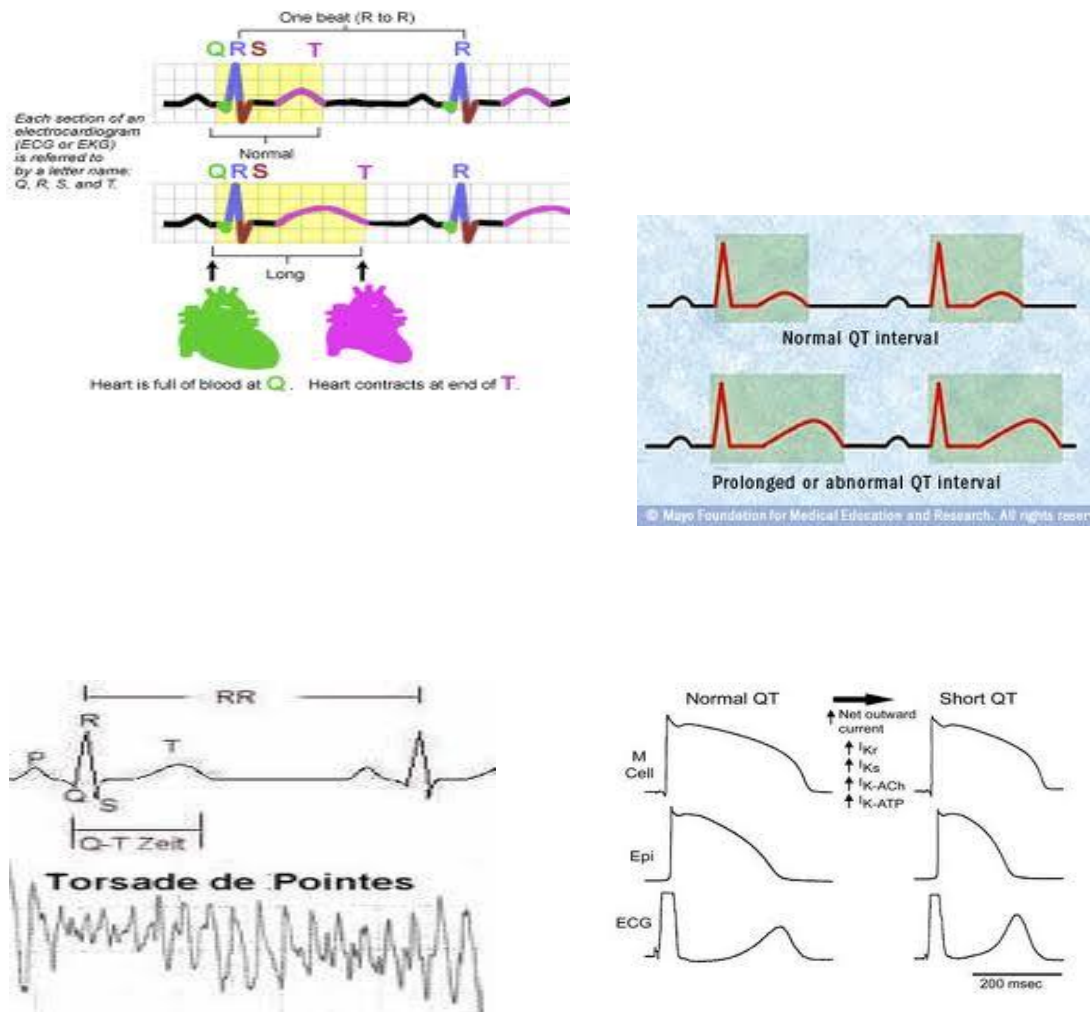


Figura8. Esempi di tracciati elettrocardiografici relativi a sindrome del QT lungo, sindrome del QT corto e TdP.

1.3.3 Espressione dei canali *hERG1* e *hEag1* nei tumori

Questi due sottotipi di canali al potassio voltaggio attivati sono stati individuati in varie linee tumorali umane, (Tab.1) in contrasto con la loro più limitata localizzazione nei tessuti sani. Questo fattore ha contribuito

ad aumentare l'interesse verso questa grande famiglia di canali al potassio, con lo scopo di identificarne l'attività.

Canali	Linee tumorali esprimenti i canali in studio	Riferimenti bibliografici
hEag1	cancro al seno: MDA-MB-231, MCF-7 cancro colon retto: LoVo, HT-29, T84 neuroblastoma: SH-SY5Y cancro ovarico: A2780, SK-OV-3 sarcoma: TE-671 A-204 fibrosarcoma: HT-1080, Hs-633t cancro gastrico: SGC-79-01, BGC-823	Asher V. <i>et al.</i> , 2010 Ding X. <i>et al.</i> , 2006 Asher V. <i>et al.</i> , 2010 Asher V. <i>et al.</i> , 2010 Mello F. <i>et al.</i> , 2006 Mello F. <i>et al.</i> , 2006 Spitzner M. <i>et al.</i> , 2007
hERG1	leucemia: HL-60, Molt-4 cancro gastrico: SGC-79-01, BGC-823 cancro colon retto: Colo205 cancro al seno: MCF-7 cancro ovarico: SK-OV-3, A2780	Li H. <i>et al.</i> , 2009 Spitzner M. <i>et al.</i> , 2007 Dolderer J.H. <i>et al.</i> , 2009 Roy J. <i>et al.</i> , 2008 Asher V. <i>et al.</i> , 2010

Tabella1. Linee tumorali umane in cui sono espressi i due canali hEag1 e hERG1, e riferimenti alla letteratura

CANALE hEag1

Questo canale al potassio voltaggio attivato risulta iperespresso in varie linee tumorali umane (Tab.1), con un ruolo prevalente nel controllo della proliferazione cellulare; l'utilizzo di bloccanti specifici e non, ha evidenziato una diminuzione del numero di cellule tumorali nelle linee in cui è risultato iperespresso [Hemmerlein B. *et al.*, 2006]. Un fattore molto importante, responsabile anche dell'importanza che questo canale inizia ad assumere negli studi riguardanti lo sviluppo dei tumori nell'uomo, è la scarsa espressione di hEag1 nei corrispondenti tessuti sani [Hemmerlein B. *et al.*, 2006].

✓ Cancro al seno

Il canale hEag1 sembra promuovere la proliferazione cellulare nelle linee tumorali MCF-7 e MDA-MB-231 contribuendo allo sviluppo del tumore [Asher V. *et al.*, 2010; Garcìa-Becerra R. *et al.*, 2009]. Utilizzando un bloccante non selettivo per questo canale, l'Astemizolo, è stato evidenziato un effetto inibitorio sulla proliferazione tumorale di queste due linee di cancro al seno, con blocco del ciclo cellulare nella fase G1; questa molecola sembra ridurre l'espressione di due tipi di cicline, D1 ed E, fondamentali per la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Questo risultato lascia pensare ad un coinvolgimento di hEag1 nella proliferazione tumorale [Borowiec A. *et al.*, 2011].

✓ Cancro del colon retto

Nelle due linee tumorali umane LoVo e HT29, è stata evidenziata un'iperespressione di hEag1, mentre analizzando tessuti e cellule sane questo sottotipo di canale al potassio voltaggio attivato non risulta

espresso. Sembra indurre proliferazione ed essere indispensabile per la crescita delle cellule tumorali [Ding X. *et al.*, 2006].

✓ Cancro ovarico

L'espressione di hEag1 a livello dell'ovaio è molto bassa, mentre aumenta notevolmente nella linea tumorale SK-OV-3. Per cercare di individuare il ruolo di questo canale in questa linea cellulare tumorale sono stati testati alcuni bloccanti come l'Imipramina; è stata evidenziata una riduzione della proliferazione cellulare [Asher V. *et al.*, 2011].

✓ Sarcoma

Il canale hEag1 risulta molto espresso nelle linee cellulari di sarcoma A-204, TE-671, HT-1080, Hs-633t ed anche nei tessuti coinvolti nella neoplasia. Le linee tumorali sopra testate sono state trattate con Imipramina, bloccante hEag1 selettivo; si è potuta riscontrare una riduzione della proliferazione cellulare in seguito al trattamento, a testimonianza del possibile ruolo pro-proliferativo del canale hEag1 [Mello De Queiroz F. *et al.*, 2006].

✓ Cancro gastrico

Nelle linee cellulari tumorali BGC-823 e SGC-7901, il canale hEag1 risulta essere notevolmente espresso, e lo si ritrova anche nei tessuti interessati da questo tipo di neoplasia; sembra essere coinvolto nella proliferazione delle cellule di tumore, e l'utilizzo di bloccanti di questo sottotipo di canale Kv sembra provocare l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 [Kim H. *et al.*, 2010] avvalorando la tesi di una partecipazione di hEag1 nello sviluppo del cancro.

CANALE hERG1

Varie linee cellulari tumorali hanno evidenziato un'iperespressione di questo membro della famiglia dei canali al potassio voltaggio attivati rispetto ad una sua più limitata localizzazione fisiologica. Sembra essere prevalentemente coinvolto in vari aspetti caratteristici della patologia tumorale, in particolare nella migrazione e nella regolazione del volume cellulare [Roy J. *et al.*, 2008].

✓ Leucemia

Nelle linee cellulari HL-60 e Molt-4 il canale hERG1 sembra interagire con il fattore SDF-1 che induce la migrazione delle cellule leucemiche. Con l'utilizzo del bloccante selettivo E-4031 è stata riscontrata una forte inibizione della migrazione, confermando quindi un probabile ruolo di hERG1 in questo tipo di attività [Li H. *et al.*, 2009], e un blocco delle cellule leucemiche nel passaggio dalla fase G2/S del ciclo cellulare [Roy J. *et al.*, 2008].

✓ Cancro gastrico

Il canale hERG1, altamente espresso nelle linee cellulari di cancro allo stomaco SGC-7901 e BGC-823, favorisce la progressione del tumore. L'iperespressione di questo sottotipo di canale nel cancro gastrico suggerisce che questa proteina potrebbe rappresentare un indice di malignità di questo tipo di tumore [Kim H. *et al.*, 2010].

✓ Cancro del colon retto

L'espressione di hERG1 è elevata nelle linee di tumore al colon Colo205, mentre risulta assente nelle cellule normali della mucosa. Studi effettuati con il bloccante selettivo E-4031 hanno evidenziato

una riduzione nel numero di cellule neoplastiche, suggerendo un possibile ruolo di hERG1 come fattore diagnostico [Camacho J., 2005].

✓ Cancro al seno

La linea cellulare tumorale MCF-7 esprime questo sottotipo di canale al potassio; il ruolo che questo membro della famiglia *eag* assume in questa neoplasia è diverso da quello svolto dall'altro sottotipo hEag1. Il canale hERG1 sembra partecipare alla regolazione del volume cellulare, e questa osservazione può essere supportata dal mancato effetto del bloccante selettivo E-4031 sulla proliferazione delle cellule tumorali MCF-7 [Roy J. *et al.*, 2008].

1.3.4 Bloccanti/Apritori dei canali hERG1 e hEag1 e meccanismo d'azione

Composto	Profilo farmacologico
Imipramina	Bloccante hEag1 selettivo
E-4031	Bloccante hERG1 selettivo
PD118057	Apritore hERG1 selettivo
Astemizolo	Bloccante non selettivo hEag1/hERG1
4Aminopiridina	Bloccante non selettivo hEag1/hERG1
Calcitriolo	Bloccante non selettivo hEag1/hERG1
TEA	Bloccante canali K ⁺

IMIPRAMINA

La struttura chimica dell'Imipramina è indicata in figura 9.

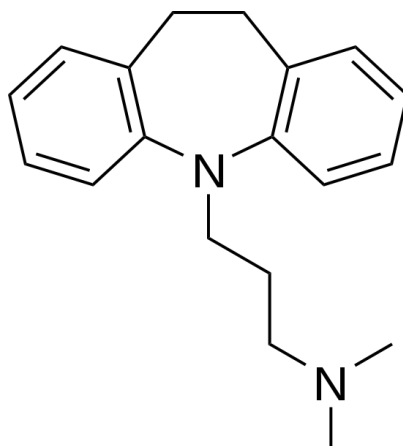


Figura9. Struttura chimica dell'Imipramina

Questa molecola è comunemente conosciuta come antidepressivo, appartenente alla categoria degli antidepressivi triciclici. Svolge anche un'azione bloccante selettiva sul canale hEag1, azione che dipende dal voltaggio. Il suo sito di legame sembra essere a livello della porzione intracellulare del canale, e questo sito risulta accessibile solo quando il canale è aperto. La forma attiva del composto sembra essere quella protonata; quando il canale hEag1 è aperto si crea un allargamento della porzione intracellulare del canale stesso che permette ad una molecola grande come l'Imipramina di raggiungere l'estremità interna del filtro di selettività e bloccare il canale [García-Ferreiro R. *et al.*, 2004]. I residui aminoacidici presenti nel segmento transmembrana S6 e quelli presenti nell'estremità C-terminale delle eliche del poro appena prima del filtro di selettività sembrano essere importanti per il legame al canale hEag1 dei differenti composti, tra cui l'Imipramina; a livello del filtro di selettività sembra essere presente nella prima posizione una Ser o una Thr, mentre

la posizione seguente pare essere occupata da Val o Ile [García-Ferreiro R. *et al.*, 2004].

ASTEMIZOLO

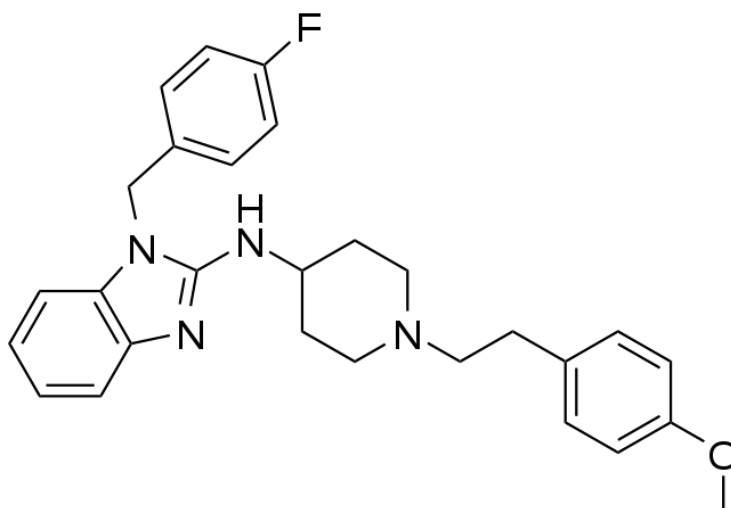


Figura10. Struttura chimica dell'Astemizolo

Questa molecola (fig.10) è normalmente utilizzata come antistaminico di seconda generazione, con azione bloccante il recettore H1 dell'Istamina. E' stata evidenziata anche un'azione sui canali al potassio a voltage attivati; è un bloccante non selettivo hEag1/hERG1. L'astemizolo sembra bloccare il canale hEag1 in maniera indipendente dal voltage, e sembra agire nella forma protonata. Come l'Imipramina, sembra legarsi alla porzione intracellulare, raggiungibile solo quando il canale si trova nella conformazione aperta, e la dissociazione dal sito di legame sembra avvenire prima che il canale si chiuda. Il canale hEag1 sembra avere un sito di legame idrofobico ausiliario nella porzione intracellulare, che accoglie le catene laterali di Astemizolo [García-Ferreiro R. *et al.*, 2004]. L'Astemizolo va a bloccare anche l'altro canale al potassio a voltage

attivato, hERG1; questo potrebbe essere attribuibile a residui aminoacidici presenti in differenti posizioni nei domini di legame dei due canali [García-Ferreiro R. *et al.*, 2004].

E-4031

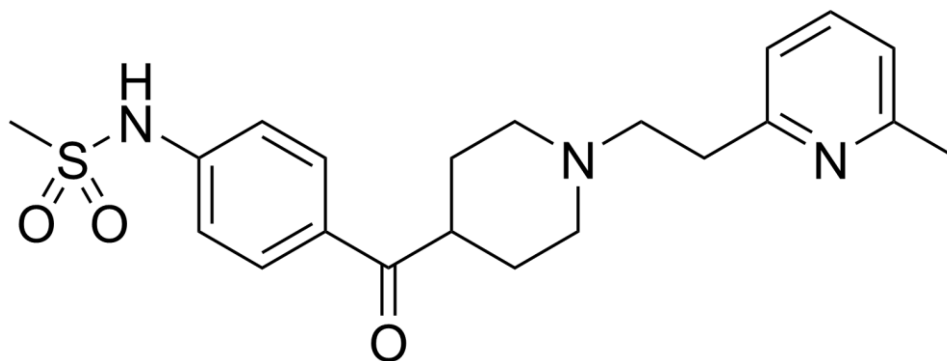


Figura11. Struttura chimica del composto E-4031

Questa molecola di sintesi (fig.11) è un bloccante hERG1 selettivo. E' stato utilizzato in varie linee cellulari tumorali dove ha portato ad una riduzione significativa della proliferazione [Li H. *et al.*, 2007]. Questo composto sembra provocare il blocco del ciclo cellulare al momento del passaggio delle cellule dalla fase G1 alla fase S, arrestando quindi la crescita cellulare; si ha un aumento del numero di cellule che si fermano alla fase G1, mentre diminuiscono quelle che passano alla fase S successiva. L'E-4031 non sembra interferire invece nel passaggio dalla fase G2 alla fase M [Li H. *et al.*, 2007].

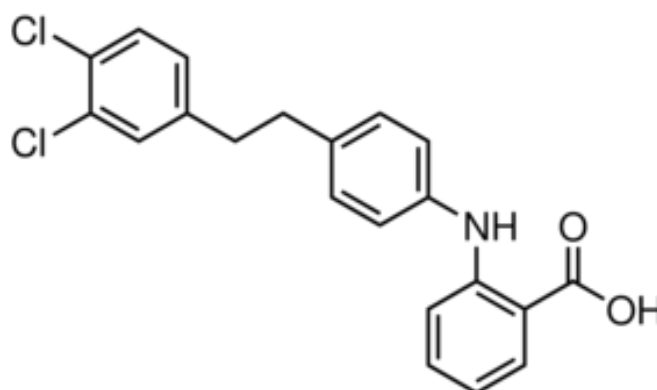
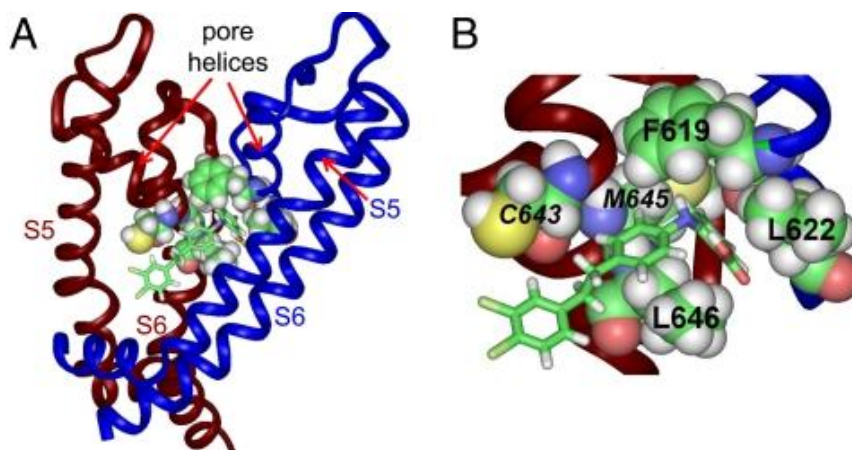
PD118057

Figura12. Struttura chimica del composto PD118057

Questa molecola (fig.12) è un apritore hERG1 selettivo. E' stata osservata un'azione sia agonista che antagonista di questo composto sul canale hERG1; la differente attività sembra essere dovuta ai diversi siti di legame con cui il PD118057 sembra interagire [Perry M. *et al.*, 2009]. L'attività hERG1 agonista sembra dipendere dall'interazione del PD118057 con un sito localizzato tra il segmento S6 di una subunità α e l'elica poro della subunità α adiacente: l'acido benzoico interagisce con due residui del poro, F619 e L622, mentre il fenile centrale, tramite interazione idrofobica, si lega al residuo L646 di S6 [Perry M. *et al.*, 2009].



L'attività bloccante di questa molecola sembra invece essere dovuta all'interazione con altri siti di legame, come quello F656 localizzato nel segmento transmembrana S6 della subunità α del canale[Perry M. *et al.*, 2009].

1.4 Canali hEag1 e hERG1 nel melanoma cutaneo

Per quanto riguarda l'espressione e il ruolo funzionale di questi due sottotipi di canali al potassio voltaggio attivati nel melanoma cutaneo, esistono pochi dati al riguardo. Questi due canali sono stati identificati in alcune linee tumorali umane di melanoma cutaneo:

IGR1	IGR39	IPC298	MDA-MB-435S
------	-------	--------	-------------

Il ruolo del canale hERG1 è stato ipotizzato attraverso l'utilizzo del bloccante selettivo, E-4031, sulla linea cellulare MDA-MB-435S; in questa linea tumorale, le cellule esprimono il canale funzionale. In presenza del bloccante E-4031 è stata evidenziata una riduzione della migrazione cellulare, ma non è stato possibile riscontrare una diversa distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento del canale hERG1 nei processi di migrazione cellulare [Afrasiabi E. *et al.*, 2009]; nelle cellule MDA-MB-435S hERG1 sembra modulare la crescita tramite interazioni con proteine di membrana [Afrasiabi E. *et al.*, 2009].

L'altro membro dei canali al potassio voltaggio attivati oggetto di studio, hEag1, è risultato iperespresso nelle linee tumorali di melanoma umano IGR1 e IPC298. Anche in questo caso è stato investigato il ruolo

funzionale di questo canale utilizzando un bloccante selettivo, l'Imipramina; questo composto ha determinato una diminuzione della proliferazione cellulare, facendo pensare ad un coinvolgimento di hEag1 nel processo di proliferazione [Gavrilova-Ruch O. *et al.*, 2006]. Investigando un possibile ruolo di hEag1 nella progressione del ciclo cellulare sulla linea IGR1 è stata evidenziata un'alta espressione di hEag1 nella fase G1, con aumento del flusso di ioni potassio e conseguente iperpolarizzazione della membrana. Poiché nelle cellule tumorali l'iperpolarizzazione del canale è un elemento sufficiente a far progredire le cellule nel ciclo cellulare questo lascia pensare ad un coinvolgimento di questo sottotipo di canale nei processi di proliferazione delle cellule IGR1 di melanoma [Gavrilova-Ruch O. *et al.*, 2006].

Capitolo 2

Scopo della ricerca

I canali al potassio voltaggio attivati sono proteine attivate da variazioni di voltaggio. Regolano il flusso di ioni K^+ attraverso il doppio strato lipidico di membrana e sono coinvolti in diversi processi cellulari come la ripolarizzazione cardiaca, il rilascio di neurotrasmettitori e la secrezione di insulina [Asher V. *et al.*, 2011].

A questa classe di canali ionici appartiene la famiglia dei canali *Eag*, di cui fanno parte i due sottotipi hERG1 e hEag1 [Wray D., 2003].

Questi due sottotipi di canali sono limitatamente espressi in condizioni fisiologiche, mentre risultano ampiamente espressi in diversi tessuti tumorali. Sono stati ritrovati in differenti linee cellulari tumorali umane come quelle di cancro al seno, del colon retto, leucemiche, di cancro gastrico e ovarico [Roy J. *et al.*, 2008; Garcia-Becerra R. *et al.*, 2009; Asher V. *et al.*, 2011].

La loro elevata espressione in cellule neoplastiche, in contrasto con la loro assenza o scarsa presenza nelle corrispondenti cellule sane, e l'evidenza di un loro coinvolgimento nella proliferazione, migrazione e controllo del volume cellulare in condizioni tumorali [Asher V. *et al.*, 2010; Roy J. *et al.*, 2008], ha contribuito ad aumentare l'interesse verso questa famiglia di canali.

Visti i pochi dati ad oggi in letteratura relativi al ruolo dei canali hERG1 e hEag1 nel melanoma cutaneo, il più aggressivo dei tumori della pelle e altamente resistente ai regimi chemioterapici convenzionali, scopo del

presente lavoro di tesi è stato quello di indagare l'espressione di questi due canali e valutare il loro coinvolgimento nella vitalità di cellule di melanoma cutaneo umano A375, tutto questo al fine di poter comprendere se questi sottotipi di canali al potassio possano essere considerati nuovi target terapeutici per questo tipo di neoplasia.